

文章编号:1005-6947(2007)05-0446-05

· 基础研究 ·

# 胰腺癌中 p16 基因甲基化改变及其蛋白表达分析

杨卫华, 王春友, 朱求实, 阎雷, 许州

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022)

**摘要:**目的 探讨胰腺癌与癌旁组织中 p16 基因启动子区异常甲基化的改变及其蛋白表达的特点, 以及其与胰腺癌发生发展的关系。方法 分别采用免疫组化 SP 法及甲基化特异 PCR (MSP) 检测 46 例人胰腺癌和癌旁组织中 p16 基因表达及其甲基化的水平, 并结合临床资料进行分析。结果 胰腺癌中 p16 蛋白表达率为 41.3% (19/46), 而癌旁组织表达率为 95.7% (44/46), 两者有差异显著性 ( $P < 0.01$ )。p16 蛋白阳性的 19 例胰腺癌标本中均未检出基因甲基化; p16 蛋白缺失的 27 例标本中有 18 例检出基因甲基化, 甲基化率为 39.1%。p16 基因甲基化与蛋白缺失有明显关系 ( $P < 0.05$ )。p16 基因表达及其启动子区甲基化的发生率与胰腺癌的大小, 患者性别、年龄的差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 但与组织分化程度、淋巴结转移、PTNM 分期有显著意义 ( $P < 0.05$ )。结论 p16 基因启动子的异常甲基化可影响 p16 蛋白的表达, 它们与胰腺癌的发生发展有关; p16 甲基化和蛋白表达可能成为胰腺癌诊断及预后的候选标志物之一。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(5): 446-450]

**关键词:** 胰腺肿瘤; p16 基因; 甲基化; 甲基化特异性 PCR; p16 蛋白表达

中图分类号: R735.9

文献标识码: A

## p16 gene methylation and its protein expression in pancreatic carcinoma

YANG Wei-hua, WANG Chun-you, ZHU Qiu-shi, YAN Lei, XU Zhou

(Center of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate aberrant methylation in the promoter area of p16 gene and p16 protein expression in human pancreatic carcinoma and in the corresponding tumor-adjacent tissues, and evaluate their role in the carcinogenesis and progression of tumor and its clinical significance. **Methods** Immunohistochemistry and MSP (methylation-specific PCR) were performed on 46 samples of pancreatic carcinoma and their corresponding tumor-adjacent tissue specimens for p16 and its methylation. **Results** Expression rate of p16 protein was 41.3% (19/46) in pancreatic carcinomas, 95.7% (44/46) in corresponding tumor-adjacent tissues. Through MSP, the methylation rate in pancreatic carcinomas was 39.1%. No gene methylation was found in 19 cases expressing p16 protein. p16 gene methylation was closely related to p16 protein expression in pancreatic carcinoma ( $P < 0.05$ ). The expression of p16, the aberrant methylation in the promoter area of p16 gene were no relationship with clinicopathological characteristics, such as tumor size, patient's sex and age ( $P > 0.05$ ); but were significantly related to the PTNM staging, histological differentiation, distant metastasis and lymph node metastasis ( $P < 0.05$ ). **Conclusions** Methylation in the promoter of p16 gene and p16 protein expression were associated with the development of pancreatic carcinoma and could be used as a putative prognostic indicator for malignancy.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5): 446-450]

**Key words:** Pancreatic Neoplasms; p16 Gene; Methylation; Methylation-specific PCR; p16 Protein Expression

CLC number: R735.9

Document code: A

收稿日期: 2006-12-02; 修订日期: 2007-05-08。

作者简介: 杨卫华, 男, 湖北荆门人, 华中科技大学同济医学院附属协和医院住院医师, 主要从事胰腺疾病方面的研究。

通讯作者: 杨卫华 E-mail: arhua800@yahoo.com.cn

肿瘤的发生、发展是在多因素作用下,使癌基因激活以及抑癌基因失活的结果,而两者作用的归结均在于对细胞周期的调控;细胞周期调控失常是肿瘤发生的主要原因<sup>[1]</sup>。p16 基因又称多肿瘤抑制基因(multiple tumor suppressor 1, MTS1),是1994年由美国报道的一种新型抑癌基因<sup>[2]</sup>。在胰腺癌多步骤、多阶段发生过程中有多种肿瘤相关基因参与<sup>[3]</sup>。p16 是其中一个重要的抑癌基因,参与细胞周期的调控,负调节细胞增殖及分裂。其失活机制包括缺失、突变及5' CpG 岛异常甲基化。目前已在多种肿瘤中发现5' CpG 岛异常甲基化是其失活的主要机制<sup>[4]</sup>。p16 基因甲基化和蛋白异常表达在胰腺癌中少有报道,本实验采用甲基化特异聚合酶链反应(methylation-specific PCR, MSP)和免疫组织化学对46例胰腺癌及其癌旁组织的 p16 基因启动子区的甲基化和蛋白表达,并结合临床资料进行分析,探讨两者与胰腺癌发生发展的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 标本收集 病例选自本中心2000—2005年手术切除的46例胰腺癌标本(患者术前均未接受化疗和放疗)。男27例,女19例;年龄41~68(平均55.4)岁。将所有患者按临床病理学参数(肿瘤大小/分化程度/PTNM分期/转移)分类。标本为石蜡包埋存档蜡块。取胰腺癌及癌旁组织(距瘤体边缘以远2cm),行4 $\mu$ m连续切片分别进行免疫组化染色;行8~10 $\mu$ m连续切片作 p16 基因甲基化分析。

1.1.2 主要试剂及仪器 兔抗人 p16 蛋白多克隆抗体、SP试剂盒及DAB显示剂购自北京中山生物技术有限公司; Wizard DNA 纯化试剂盒、TaqDNA 聚合酶购自美国 Promega 公司; 氢氧化钠、亚硫酸氢钠、琼脂糖凝胶等均购自武汉大风生物科技有限公司; PCR 扩增仪,凝胶成像系统由本院普外科实验室提供。

### 1.2 实验方法

1.2.1 免疫组化染色 所有标本经10%福尔马林固定,连续切片4 $\mu$ m;石蜡切片脱蜡,水化后分别行DAB及SP法染色。操作按说明书进行,用磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗作空白对照。p16 蛋白在各细胞中的阳性表达以胞浆中出现清晰的棕色为阳性标准。HMIAS-2000型全自动彩色医学图像分析系统对每张切片随机观察10个高倍视

野。结果以阳性细胞数所占百分比表示,即每视野计数100个细胞,按阳性细胞百分数分为4个等级:低于5%为阴性(-);5%~25%为(+);25%~50%为(++);50%以上为(+++)。

1.2.2 p16 基因启动子区5' CpG 岛甲基化状态检测

1.2.2.1 DNA 提取 46例胰腺癌及相应癌旁组织均用蛋白酶K消化,用酚/氯仿抽提方法提取DNA<sup>[1]</sup>。

1.2.2.2 DNA 亚硫酸氢钠修饰及MSP

(1)引物的设计 参照 Herman 等<sup>[5]</sup>合成 p16 基因 CpG 岛的甲基化特异引物 p16-M 和非甲基化特异引物 p16-U 序列(大连宝生物公司合成),分别用于扩增 p16 基因5' CpG 岛甲基化和非甲基化的等位基因。p16-M 正义链引物为5'→3' TTATTAGAGGGTGGGGCGGATCGC;反义链引物为5'→3' GACCCCGAACCGCGACCGTAA,扩增片段长度为150bp。p16-U 正义链引物为5'→3' TTATTAGAGGGTGGGGTGGATTGT;反义链引物为5'→3' CAACCCCAAACCACAACCATAA,扩增片段长度为151bp。

(2)DNA 亚硫酸氢钠修饰 参考 Herman 等<sup>[5]</sup>的方法进行。亚硫酸氢盐修饰过程:①碱变性。取DNA约1~2 $\mu$ g,加入4mol/L的NaOH至终浓度为0.2mol/L(总体积为50 $\mu$ L),37 $^{\circ}$ C变性10min。②硫化与脱氢。加入30 $\mu$ L新配制的10mmol/L的氢醌及520 $\mu$ LpH5.0,3mol/L的NaHSO<sub>3</sub>,混匀,表面覆盖矿物油,避光,置于50 $^{\circ}$ C水浴16h。③纯化与脱硫。利用 WizardDNA 纯化试剂盒纯化修饰后的DNA,于室温下加入4mol/L的NaOH至浓度为0.3mol/L,放置5~20min脱硫。④沉淀回收。加入1/10体积的3mol/L乙酸钠及冰乙醇沉淀DNA,室温下干燥,加适量TE(pH8.0)溶解,-20 $^{\circ}$ C保存。

(3)MSP 分别对处理后的DNA进行甲基化和未甲基化扩增。PCR循环扩增条件:95 $^{\circ}$ C,5min;95 $^{\circ}$ C,30s;55 $^{\circ}$ C,30s;72 $^{\circ}$ C,30s,35个循环后72 $^{\circ}$ C,4min。4 $^{\circ}$ C保存待分析。

(4)PCR 扩增产物进行2.5%琼脂糖凝胶电泳分析并照相。

### 1.3 统计学处理

应用SPSS13.0统计软件进行处理。各组间率的比较采用 $\chi^2$ 检验和Fisher's精确概率法,以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

## 2 结果

### 2.1 胰腺癌中 p16 蛋白的表达

46 例胰腺癌中 19 例 p16 蛋白表达阳性,表达率为 41.3%; 而癌旁组织 p16 蛋白阳性表达率为 95.7%, 两者有差异显著性 ( $P < 0.01$ ) (表 1) (图 1)。p16 基因表达与胰腺癌的大小, 患者性别、年龄无关 ( $P > 0.05$ ), 而与分化程度、临床

分期和转移有关 ( $P < 0.05$ ) (表 2)。

表 1 胰腺癌及癌旁组织中 p16 蛋白的表达

组别	例数	p16 蛋白的表达			P 值
		阳性	阴性	阳性表达率(%)	
胰腺癌组织	46	19	27	41.3	<0.01
癌旁组织	46	44	2	95.7	

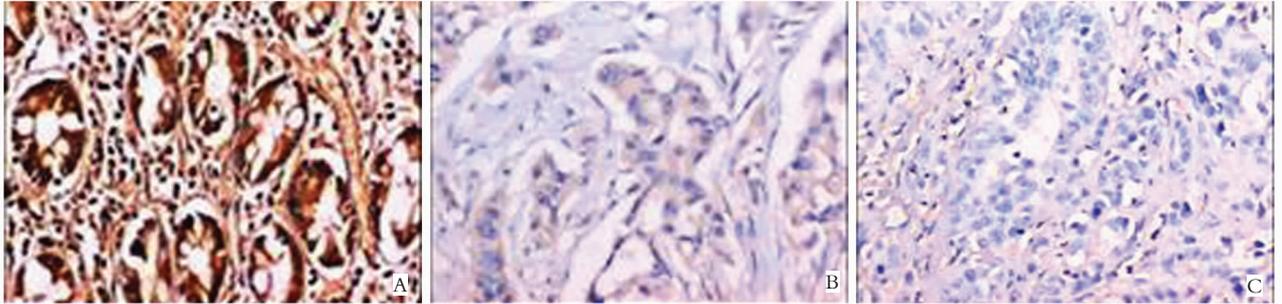


图 1 胰腺癌及癌旁组织中 p16 蛋白的免疫组化染色 (DAB × 200) A: 癌旁组织中呈强阳性; B: 癌组织中呈弱阳性; C: 癌组织中呈阴性

表 2 p16 蛋白表达及甲基化与胰腺癌临床生物学特征的关系

临床病理特征	例数	p16 蛋白阳性表达		P 值	p16 甲基化		P 值
		阳性	阳性率(%)		甲基化	甲基化率(%)	
性别							
男	27	12	44.4	>0.05	10	37.0	>0.05
女	19	7	6.8		8	42.1	
年龄(岁)							
<55	10	2	20.0	>0.05	4	40.0	>0.05
≥55	36	17	47.2		14	38.9	
肿瘤直径(cm)							
<3	11	3	27.3	>0.05	3	27.3	>0.05
≥3	35	16	45.7		15	42.9	
肿瘤分化程度							
高	20	13	65.0	<0.05	2	10.0	<0.05
中、低	26	6	23.1		16	61.5	
淋巴结转移							
有	18	1	5.60	<0.05	12	66.7	<0.05
无	28	18	64.3		6	21.4	
器官转移							
有	9	1	11.1	<0.05	7	77.8	<0.05
无	37	18	48.6		11	29.7	
PTNM 分期							
I, II	28	16	57.1	<0.05	5	17.9	<0.05
III, IV	18	3	16.7		13	72.2	

### 2.2 胰腺癌中 p16 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化

PCR 扩增产物电泳出现以下 3 种结果:(1) 甲基化特异引物扩增出目的条带(150bp),而非甲基化特异引物无条带扩出,称为甲基化;(2) 非甲基化特异性引物扩增出目的条带(151bp),而甲基化引物无条带扩出,称为非甲基化;(3) 两对引物均扩增出目的条带,称为半甲基化或部分甲基化,也属于甲基化(图 2)。

46 例胰腺癌中 18 例 p16 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化,甲基化率为 39.1%;癌旁组织中 3 例甲基化,甲基化率为 6.5%,两组间有差异显著性( $P < 0.01$ )(表 3)。p16 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化的发生率与胰腺癌的大小及患者的性别、年龄的差异无统计学意义( $P > 0.05$ ),但在组织分化程度、有无转移、PTNM分期上有统计学意义( $P < 0.05$ )(表 2)。

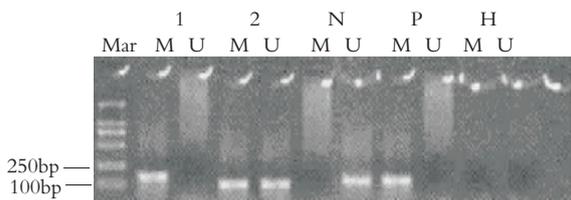


图 2 PCR 扩增产物电泳结果判定 U:非甲基化扩增产物(151bp);M:甲基化扩增产物(150bp);1:显示存在甲基化;2:显示存在半甲基化;N:正常胰腺组织;P:阳性对照标本(以反复多次 MSP 检测均为甲基化阳性的 6 号标本作为阳性对照);H:为 H<sub>2</sub>O,未加模板 DNA 的混合物;Mar:为分子量为 2 000bp 的 DNA Marker(梯度为:100,250,500,750,1 000,2 000bp)

表 3 胰腺癌及癌旁组织中 p16 基因甲基化

组别	例数	p16 基因甲基化			P 值
		甲基化	未甲基化	甲基化率(%)	
胰腺癌组织	46	18	28	39.1	<0.01
癌旁组织	46	3	43	6.50	

### 2.3 胰腺癌中 p16 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化与蛋白表达之间的关系

27 例 p16 蛋白阴性的胰腺癌中 p16 基因甲基化 18 例;19 例 p16 蛋白阳性者未检出基因甲

基化,两者有明显的相关性( $P < 0.05$ )(表 4)。

表 4 胰腺癌 p16 基因启动子区 5' CpG 岛异常甲基化和蛋白缺失间的关系

p16 基因	p16 蛋白的表达		P 值
	阳性	阴性	
甲基化	0	18	<0.05
非甲基化	19	9	
合计	19	27	

### 3 讨论

p16 基因是迄今发现的最为广泛的抑癌基因之一,参与多种肿瘤的发生、发展;p16 基因定位于人染色体 9p21,编码产物是 16kD 的蛋白;即 p16 蛋白,定位于细胞核内。此种蛋白质是一种细胞周期蛋白依赖性激酶 4(CDK4)的抑制因子(CDK4I),可与细胞周期蛋白 D(cyclinD)竞争性结合 CDK4,从而抑制 cyclinD-CDK4 的催化活性,抑制了 Rb 蛋白的磷酸化,使其不能通过 G1/S 调控点而被阻滞于 G1 晚期。

CpG 岛的异常甲基化是指 DNA 基因启动子区 CG 重复 50% 区域,在甲基化转移酶(DMT)的作用下,由 S-腺苷酸(SAM)提供甲基,使 DNA 上的胞嘧啶(C)的 5 位碳上加上一个甲基基团,形成 5-甲基胞嘧啶(5mC),引起基因表达降低,而 DNA 顺序及基因产物不变,是导致基因组不稳定性而引发肿瘤的重要机制。研究发现,在多种肿瘤中 DNA 甲基化与肿瘤发生有关,表现为抑癌基因的高甲基化和癌基因的低甲基化,而也有关于胰腺癌中 p16 基因 CpG 岛的异常甲基化的报道<sup>[6-7]</sup>。

Naka 等<sup>[8]</sup>用免疫组化方法分析 32 例原发性胰腺癌,有 19 例 p16 蛋白阳性,阳性率为 59%,p16 蛋白与胰腺癌临床分期及生存期密切相关。Hu 等<sup>[9]</sup>将胰腺癌、慢性胰腺炎及正常组织进行对比研究,结果 p16 蛋白阳性率分别为 58.1%,95% 和 100%。本研究中,46 例原发性胰腺癌组织及相应癌旁组织分别有 19 例(41.3%)和 44 例(95.7%)p16 蛋白表达阳性,两者有差异显著性( $P < 0.05$ )。提示 p16 蛋白表达与原发性胰腺癌的发生有密切关系。结合临床资料分析,癌

组织中 p16 蛋白阳性率与组织学分化、转移及临床病理分期有密切关系(组间差异均为  $P < 0.05$ )。因此认为, p16 蛋白的检测可作为胰腺癌的一个肿瘤标志, 在辅助诊断和预后判断中有一定的价值。

p16 基因失活的机制至少有 3 种: 基因的纯合性缺失、基因突变和启动子区甲基化。p16 基因 5' CpG 岛异常甲基化是 p16 基因失活的原因之一, 主要是外显子 1, 2 的高度甲基化导致基因转录抑制, p16 蛋白表达的下降, 必然削弱其对细胞增殖的控制, 从而导致细胞恶性转化, 最终形成肿瘤。Herman 等<sup>[10]</sup> 的研究显示, 细胞系中 p16 基因 5' CpG 岛异常甲基化发生率结肠癌为 92%, 前列腺癌 60%, 乳腺癌 33%, 肾癌 23%。Gonzalez-Zulueta 等<sup>[11]</sup> 报道, 在未培养的膀胱癌和细胞系中 p16 基因甲基化发生率分别为 60% (12/18) 和 39% (12/31)。本研究利用 MSP 法测定 p16 基因启动子区甲基化的改变发现: p16 蛋白阳性的 19 例胰腺癌标本, 均未检出基因甲基化; p16 蛋白阴性的 27 例标本, 有 18 例检出基因甲基化; 甲基化率为 39.1%。46 例癌旁组织中有 3 例基因甲基化, 胰腺癌和癌旁组织甲基化率差异的显著性 ( $P < 0.05$ )。基因甲基化与 p16 蛋白表达明显相关 ( $P < 0.05$ )。p16 基因启动子区甲基化的发生率与胰腺癌的大小及患者的性别、年龄分组间的差异无显著意义 ( $P > 0.05$ ), 但在组织分化程度、有无转移、PTNM 分期上有显著意义 ( $P < 0.05$ )。p16 甲基化与 p16 基因失转录明显相关, 导致基因转录抑制、p16 蛋白表达下降, 必然削弱其对细胞增殖的控制, 导致细胞恶性转化, 从而参与肿瘤的发生与发展。因此, 检测 p16 基因启动子甲基化和其表达有助于早期发现有癌变倾向的细胞, 还可作为分子指标, 预测对化疗的反应和判定预后等。

基因异常甲基化的发现也为肿瘤治疗提供了新思路, DNA 甲基化抑制剂 5-脱氧杂氮胞苷在临床上已被用于肿瘤的化疗<sup>[12]</sup>。这些不仅证实了 CpG 岛异常甲基化参与了肿瘤的发生发展, 也为利用基因异常靶点进行肿瘤基因治疗提供了依据, 同时也为研究肿瘤的药物治疗提供了新的途径。

综上所述, p16 基因启动子异常甲基化的改

变可能影响 p16 蛋白的表达; p16 甲基化、蛋白表达与胰腺癌的发生发展密切相关。p16 甲基化和蛋白表达可望成为胰腺癌诊断及预后的候选标志物之一。

#### 参考文献:

- [1] Yasui W, Yokozaki H, Fujimoto J, *et al.* Genetic and epigenetic alterations in multistep carcinogenesis of the stomach [J]. *Gastroenterol*, 2000, 35(12): 111 - 115.
- [2] Kamb A, Gruis NA, Wearer-Feldhaus J, *et al.* A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types [J]. *Science*, 1994, 264(5157): 436 - 440.
- [3] 东星, 周卫东. 胰腺癌的分子生物学研究展 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(6): 454 - 456.
- [4] Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age [J]. *Nat Genet*, 1999, 21(2): 163 - 167.
- [5] Herman J G, Graff J R, Myohanen S, *et al.* Methylation-specific PCR: A novel PCR assay for methylation status of CpG island [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18): 9821 - 9826.
- [6] Ueki T, Toyota M, Sohn T, *et al.* Hypermethylation of multiple genes in pancreatic adenocarcinoma [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(7): 1835 - 1839.
- [7] Sato N, Ueki T, Fukushima N, *et al.* Aberrant methylation of CpG islands in intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas [J]. *Gastroenterology*, 2002, 123(1): 365 - 372.
- [8] Naka T, Kabayashi M, Ashida K, *et al.* Aberrant p16INK4 expression related to clinical stage and prognosis in patients with pancreatic cancer [J]. *Int J Oncol*, 1998, 12(5): 1111 - 1116.
- [9] Hu Y X, Watanabe H, Ohtsubo K, *et al.* Frequent loss of p16 expression and its correlation with clinicopathological parameters in pancreatic carcinoma [J]. *Clin Cancer Res*, 1997, 3(9): 1473 - 1477.
- [10] Herman J G, Merlo A, Mao L, *et al.* Inactivation and CKN/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human [J]. *Cancer Research*, 1995, 55(20): 4525.
- [11] Gonzalez-Zulueta M, Bender CM, Yang AS, *et al.* Methylation of the 5' CpG island of the p16/CDKN2 tumor suppressor gene in normal and transformed tissues correlates with gene silencing [J]. *Cancer Research*, 1995, 55(20): 4531.
- [12] Suh SI, Pyun HY, Cho JW, *et al.* 5-Aza-2'-deoxycytidine leads to down-regulation of aberrant p16INK4A RNA transcripts and restores the functional retinoblastoma protein pathway in hepatocellular carcinoma cell lines [J]. *Cancer Lett*, 2000, 160(1): 81 - 88.